PLFA 测定操作规程

试 剂:

1、磷酸缓冲液[$c(K_2HPO_4)$ = 0.05 mol • L^{-1}]：34.84 g K_2HPO_4加入 12ml $CHCL_3$再加入超纯水稀释到 4000；

2、提取液[v（CH_3OH）：v（$CHCL_3$）：v（磷酸缓冲液）= 2：1：0.8]：526 ml CH_3OH加入 263 ml $CHCL_3$再加入 210 ml 磷酸缓冲液；

3、甲醇甲苯混合液[v（甲醇）：v（甲苯）：=1：1]：取 100 ml 甲醇和 100 ml 甲苯混合；

4、甲基化醋酸[$c(CH_3COOH)$ =1 mol •L^{-1}]：4.60 ml CH_3COOH加入 80 ml 超纯水；

5、甲基化氢氧化钾[$c(KOH)$ =0.2 mol •L^{-1}]：28.05 g KOH溶解于 1000 ml 超纯水 中为 0.5M KOH溶液，再取 40 ml 0.5 M KOH溶液加入 60 ml CH_3OH为 0.2M KOH溶液。

PLFA 提取操作流程：

实验前准备工作 1、土壤过 2 mm 筛，用镊子捡出根、凋落物碎屑及小石块；

2、20 克左右土壤样品置于铝盒中，称盒+鲜土重

↓

105 烘干，称盒+ 干土重

↓

计算土壤含水量；

3、配制试剂，准备实验用品。

注意：所有玻璃器皿（试管、小瓶及瓶盖等）在实验前均须用正己烷清洗，晾干。实验操作时必须戴丙腈橡胶手套。

实验第一天

① 称取相当于 8g 干重的土壤，置于 35ml 离心管中

② 向离心管中加入 5ml 磷酸缓冲液（用 5ml 移液枪，将含水量计入），再加入 6ml 三氯甲烷，12ml 甲醇（用移液瓶）

③ 振荡 2 小时

⑤ 25℃，3500 rpm，离心 10 分钟

⑥ 上层离心液倒入分液漏

④ 加 12ml 三氯甲烷，12ml 磷酸缓冲液于分液漏斗中

⑦ 加入 23ml 提取液于离心管中的剩余土壤中，手工摇动

⑧ 振荡 30 分钟

⑨ 25℃，3500 rpm，离心 10 分钟

⑩ 上层离心液倒入分液漏斗

⑫ 摇动 2 分钟，静置过夜

⑪ 下层加水，摇动，丢弃多余土壤，用清洗剂洗刷离心管

⑬ 将分液漏斗中下层溶液放入大试管 A 中

⑭ **30-32℃水浴，N_2浓缩**

实验第二天

⑮ 加 3ml 三氯甲烷调解萃取小柱（5ml 移液枪）

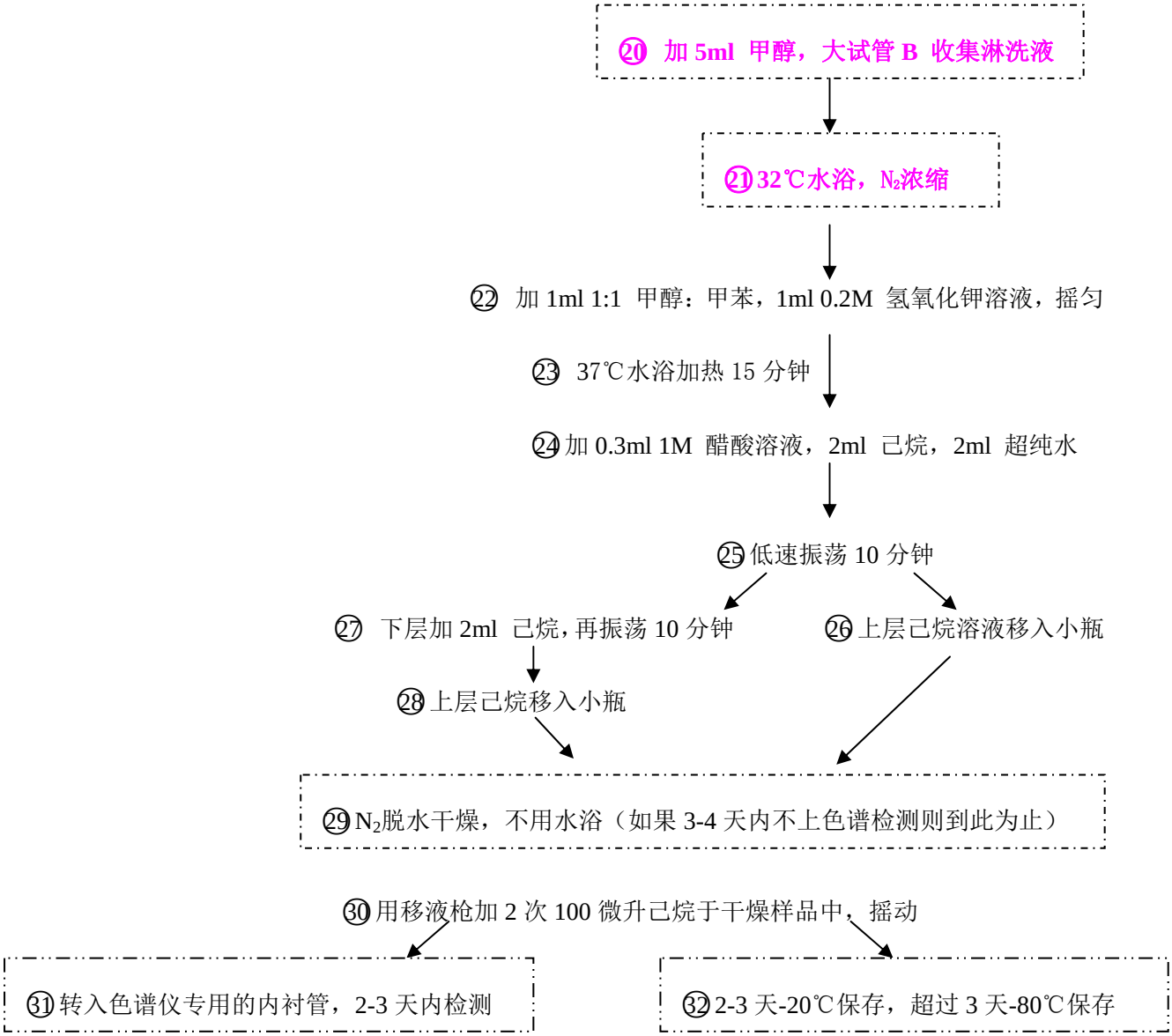
⑯ 5 份 200 微升三氯甲烷转移浓 缩磷脂到萃取小柱（用 250 或 500 微升移液枪，第 1-2 次转移时直接从试管底部吸取，第 3-5 次转移时则在转移前用移液枪冲洗试管内壁。

⑰ 向萃取小柱加入 5ml 三氯甲烷

⑱ 加 2 次 5ml 丙酮

⑲ 甲醇清洗萃取小柱底部

弃去


⑳ 加 5ml 甲醇，大试管 B 收集淋洗液
㉑ 32℃水浴，N_2浓缩
㉒ 加 1ml 1:1 甲醇：甲苯，1ml 0.2M 氢氧化钾溶液，摇匀
㉓ 37℃水浴加热 15 分钟
㉔ 加 0.3ml 1M 醋酸溶液，2ml 己烷，2ml 超纯水
㉕ 低速振荡 10 分钟
㉗ 下层加 2ml 己烷，再振荡 10 分钟
㉖ 上层己烷溶液移入小瓶
㉘ 上层己烷移入小瓶
㉙ N_2脱水干燥，不用水浴（如果 3-4 天内不上色谱检测则到此为止）
㉚ 用移液枪加 2 次 100 微升己烷于干燥样品中，摇动
㉛ 转入色谱仪专用的内衬管，2-3 天内检测
㉜ 2-3 天-20℃保存，超过 3 天-80℃保存